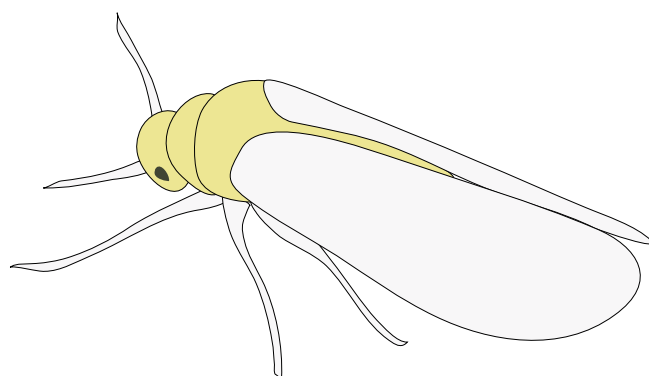
タバココナジラミ
バイオタイプQ検出キット

Bemisia tabaci Q biotype Detection Kit

取扱説明書

version 4.0.0

製品コード
NE0061

タバココナジラミバイオタイプ Q 検出キット
取扱説明書 version 4. 0. 0

【はじめにお読みください】

この度は、**タバココナジラミバイオタイプ Q 検出キット**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いてタバココナジラミのバイオタイプ Q を検出することにより、バイオタイプが Q であるか Q 以外であるかを判定するための試薬です。医療行為及び臨床診断等の目的では使用できません。

2. **取扱説明書**、**検査用チューブ**以外の試薬は−20℃ の冷凍庫内に遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却及び試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。

3. 本キットを使用する際は、この取扱説明書の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法及び使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

4. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

5. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプル及び**WF 陽性コントロール**の電気泳動法等による操作及びオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

6. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取扱については株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照ください。
   株式会社ニッポンジーン; http://nippongene-analysis.com/

7. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

8. LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、LAMP 法を用いたタバココナジラミのバイオタイプ検出用キットの開発、製造、及び販売を許諾されています。

9. **タバココナジラミバイオタイプ Q 検出キット**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、**e Genome Order（イーゲノムオーダー）**より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。
   株式会社富士通システムズ・イースト
   e Genome Order（イーゲノムオーダー）; http://genome.e-mp.jp/

目次

ページ

本キットに含まれる全ての LAMP プライマーセット及びこの LAMP プライマーセットを用いた LAMP 法によるタバココナジラミバイオタイプ Q の検出技術は、愛知県農業総合試験場によって開発されました。

1. キット説明

【タバココナジラミバイオタイプ Q 検出キットの概要】

本キットは、LAMP 法を利用してタバココナジラミのバイオタイプ Q を検出することにより、バイオタイプが Q であるか Q 以外であるかを判定するキットです。LAMP 法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便な DNA 増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、LAMP 法によりタバココナジラミ DNA の一部を増幅し、増幅の有無からタバココナジラミのバイオタイプを判定します。

検出に必要な操作は、タバココナジラミ1頭をキットに添付の**WF磨砕液**を用いて磨砕し、その溶液を検査溶液（**WF検査液**、**WF酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に添加した後、60℃に1時間保温するのみであり、きわめて簡便です。

検体のバイオタイプがQである場合、本キットに含まれているQ専用LAMPプライマーセットによってタバココナジラミのバイオタイプQのゲノムDNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、検体のバイオタイプがQでない場合、DNA増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でタバココナジラミのバイオタイプQを検出することが可能です。

【バイオタイプQの識別】

世界中に広く分布しているタバココナジラミは、野菜・花き等の重要害虫であり、トマト黄化葉巻ウイルス（TYLCV）を始めとする植物病害ウイルスを媒介する昆虫であることが知られています。

タバココナジラミは複数のバイオタイプに分類され、国内では従来系統（バイオタイプ JpL）の他に、バイオタイプ B（シルバーリーフコナジラミ）とバイオタイプ Q の発生が確認されています。

バイオタイプ Q は、バイオタイプ B に対して効果の高かったピリプロキシフェン剤、ネオニコチノイド系剤、合成ピレスロイド系剤への感受性が低い薬剤抵抗性個体群であるため、バイオタイプ Q に対して有効な防除対策を講じる必要があります。

両バイオタイプは外部形態による識別が不可能であるため、PCR 法や LAMP 法による核酸増幅検査が行われています。

【LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応及び簡易検出が可能である等の利点を有しています。LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。
栄研化学株式会社
Eiken GENOME SITE; http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアル ホームページをご参照ください。
株式会社ニッポンジーン マテリアル; http://www.nippongenematerial.com/

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

タバココナジラミバイオタイプ Q 検出キット
12 テスト用（製品コード: NE0061）

試薬名（チューブラベル）	頭部ラベル色	内容量	保存温度
取扱説明書	−	1 部	室温
検査用チューブ	−	24 本	室温
WF Q 検査液	赤色	87 µl	−20°C (遮光)
WF B/Q 検査液	緑色	87 µl	−20°C (遮光)
WF 酵素液	黄色	10 µl	−20°C (遮光)
蛍光発色液	紫色	10 µl	−20°C (遮光)
WF 陽性コントロール	灰色	12 µl	−20°C (遮光)
ミネラルオイル	青色	480 µl	−20°C (遮光)
WF 磨砕液	橙色	1,200 µl	−20°C (遮光)
核酸フリー水	水色	100 µl	−20°C (遮光)

取扱上の注意

＊ 本キットでは、12 テスト分の検査溶液を作製することにより、12 テスト分の検査反応を行うことが可能です。12 テスト以下の検査反応を複数回行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。

＊ **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。

＊ **取扱説明書**、**検査用チューブ**以外の試薬は−20°C で遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。

＊ **WF 磨砕液**、**核酸フリー水**は室温で遮光して保存することも可能です。

＊ 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20°C で保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。

＊ **WF 酵素液**を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却により凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。

＊ **WF 陽性コントロール**には、タバココナジラミ（バイオタイプ B 及び Q）のミトコンドリアゲノム DNA に特徴的な配列の一部が含まれています。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。

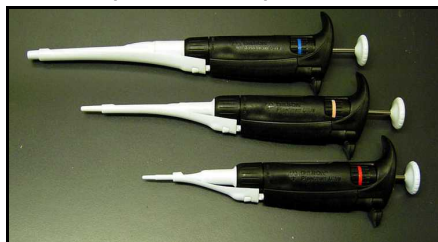
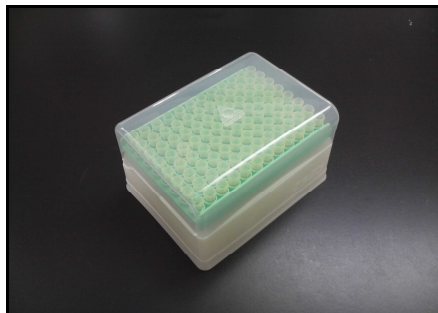
＊ 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

＊ **ミネラルオイル**に関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号）」に該当します。必ず MSDS を参照の上、使用してください。

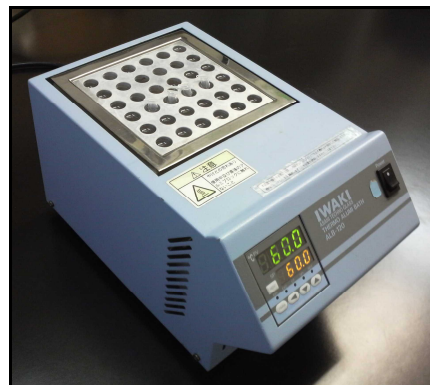
3. 必要な器具、機器、及び試薬

＊　フィルター付マイクロチップ、チューブラック、フロートプレートがセットになった**診断キットスターターセット**（製品コード: NE0051）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

【必ずご準備いただく器具、機器】

● マイクロピペット
（0.5–10 µl、10–100 µl、200–1,000 µl）

● フィルター付マイクロチップ（滅菌済）

● 検査溶液調製用チューブ
（1.5 ml あるいは 2.0 ml）

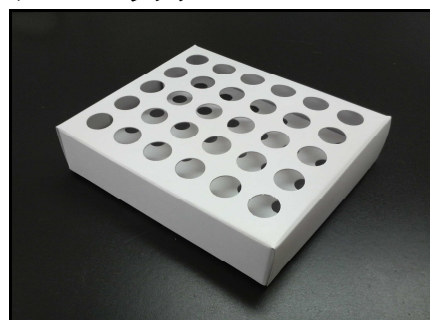
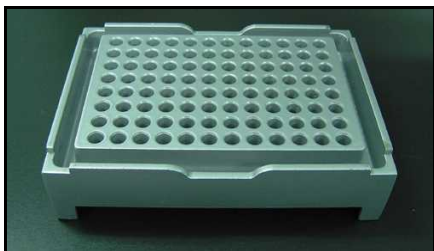
● 使い捨て手袋

● インキュベーター（恒温器）
ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、60℃ を保持する機器が必要です。

● 木製の爪楊枝

● 氷（クラッシュアイス）

【その他の器具、機器、及び試薬】

下記の器具、機器、及び試薬は本キットの使用に必須ではありませんので、必要に応じてご準備ください。

● チューブラック

● アルミラックあるいはプレートラック

● UV 照射装置
蛍光発色液による検出の際に使用します。240−260 nm あるいは 350−370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。

● ボルテックスミキサー

● 簡易遠心機（1.5 ml チューブ用）

● 簡易遠心機（0.2 ml チューブ用）

● ピンセット

● フロート

● 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

● 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液

● 70%エタノール

● ペーパータオル

● 黄色粘着板

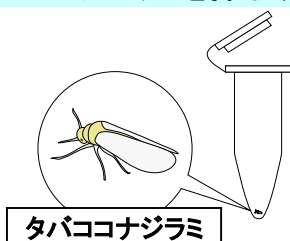
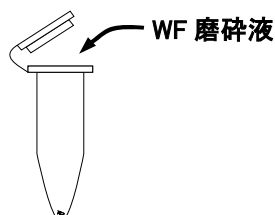
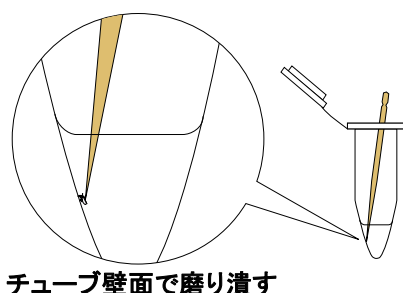
4. キット使用方法

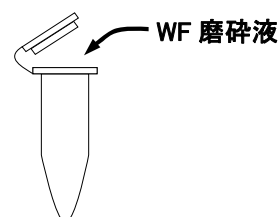
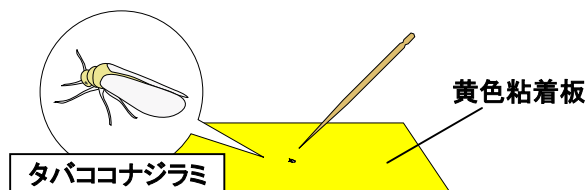
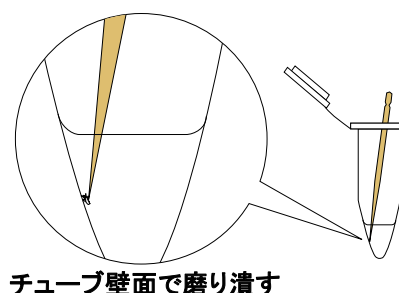
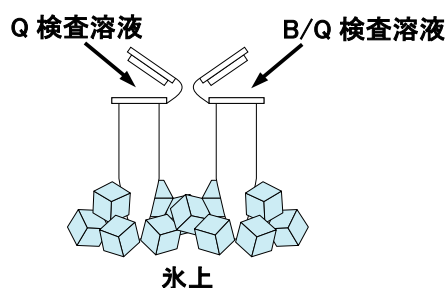
【簡易プロトコル】

本キットの詳細な使用方法は 8 ページ以降を参照してください。

簡易プロトコル

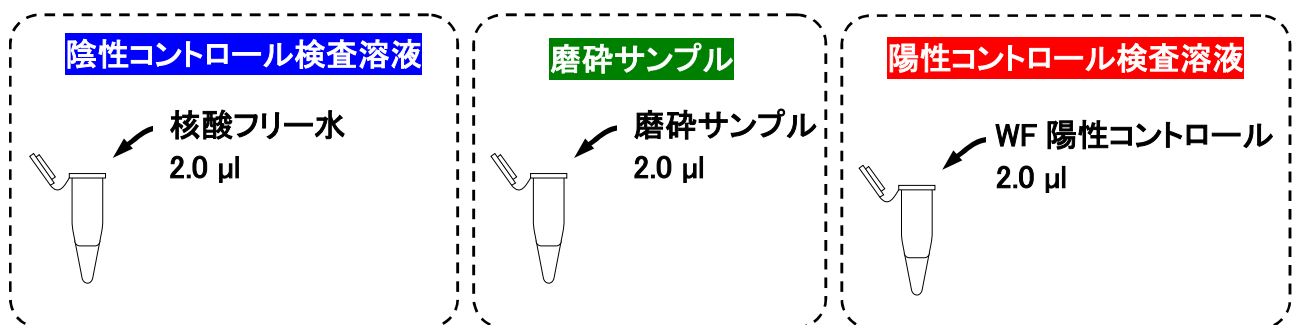
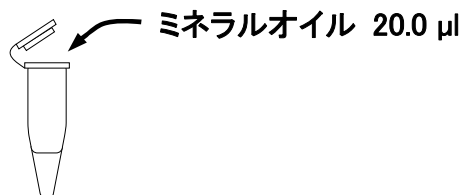
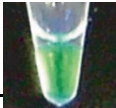
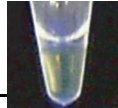
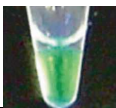
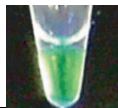
A. 直接採取法

A-1. 1.5 ml チューブに タバココナジラミを採取する

A-2. WF 磨砕液 100 µl を添加する

A-3. 爪楊枝を使って WF 磨砕液中で磨り潰す

B. 黄色粘着板採取法

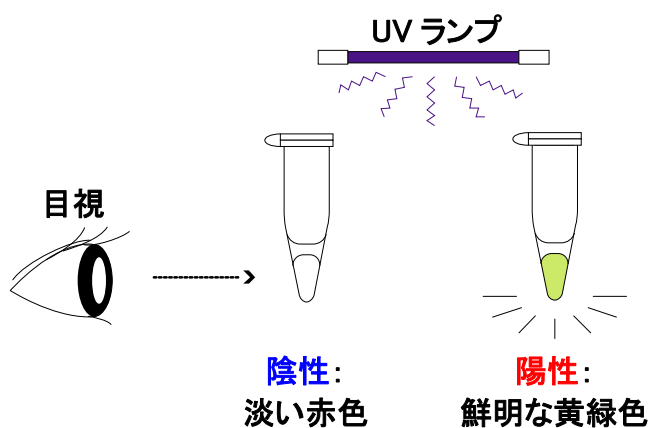
B-1. 1.5 ml チューブに WF 磨砕液 100 µl を入れる

B-2. 爪楊枝で タバココナジラミを採取する

B-3. WF 磨砕液中で磨り潰す

4. 検査溶液を必要量まとめて作製する

試薬	1 テスト	
	Q 検査溶液	B/Q 検査溶液
WF 検査液	7.2 µl	7.2 µl
蛍光発色液	0.4 µl	0.4 µl
WF 酵素液	0.4 µl	0.4 µl
検査溶液合計	8.0 µl	8.0 µl

＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、数テスト分多めに作製する。

5. 検査溶液を 1 テストあたり 8.0 µl ずつ分注する

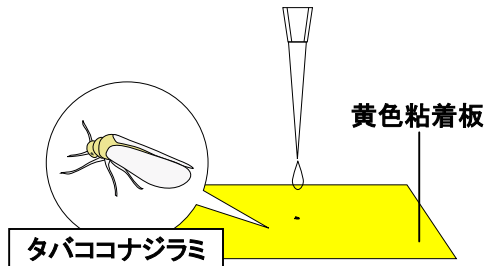
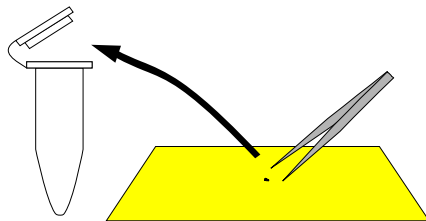
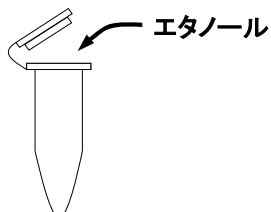
6. サンプル 2.0 µl を添加する

7. ミネラルオイルを入れる

8. 60˚C、1 時間（検査反応）

9. 80˚C、2 分間（反応停止）

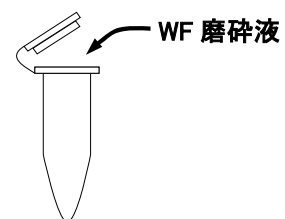
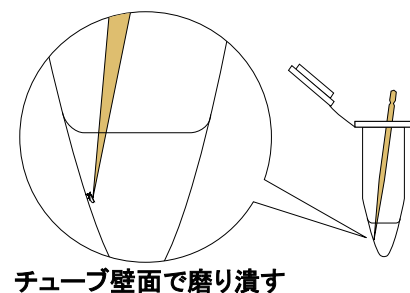
10. 判定

発色パターン	I	II
Q 検査溶液	陽性	陰性
B/Q 検査溶液	陽性	陽性
バイオタイプ	Q	Q 以外

【黄色粘着板採取法の補助プロトコル】

B'. エタノール洗浄法

B'-1. 黄色粘着板上のサンプルに
エタノール 15 μl を滴下する

B'-2. ピンセットでサンプルを
1.5 ml チューブに採取する

B'-3. エタノール 50 μl を添加する

B'-4. ボルテックスミキサーにて
撹拌により洗浄する

B'-5. スピンダウンし、エタノールを
取り除いた後、風乾する

B'-6. WF 磨砕液 100 μl を添加する

B'-7. 爪楊枝を使って
WF 磨砕液中で磨り潰す

検査を行う前の準備及び注意

【DNA サンプル】

■　コントロール

　本キットには、検査の成否を確認するための **WF 陽性コントロール**が添付されています。必要に応じて、**WF 陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」及び**核酸フリー水**を添加する「陰性コントロール検査溶液」を作製してください。

【器具、機器の準備】

■　インキュベーター（恒温器）

　インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、温度を 60°C に設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて温度が 60°C に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■　器具及び試薬

器具及び試薬名	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

【検査環境】

LAMP 法は高感度な DNA 増幅技術であるため、検査環境に **WF 陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型 DNA となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。DNA サンプルの取扱においては、作業用の着衣及び器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプル及び **WF 陽性コントロール**の電気泳動法等による操作及びオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■　作業区域

核酸抽出及び核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を<u>試薬調製作業区域</u>とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では **WF 陽性コントロール**及び LAMP 法において鋳型 DNA となる核酸を含む溶液、試薬類の取扱は行わないでください。

検査溶液への DNA サンプル及び **WF 陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の<u>核酸取扱区域</u>を設けてください。

■　核酸除去操作

器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよく濯ぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

＜方法＞

i)　使い捨て手袋を装着します。
ii)　有効塩素濃度 10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii)　次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv)　非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よく濯いで乾燥します。
v)　作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

タバコココナジラミバイオタイプ Q 検出

本キットには、2 種類の **WF 検査液**（**WF Q 検査液**及び **WF B/Q 検査液**）が含まれています。
本キットを用いたタバココナジラミのバイオタイプ識別においては、タバココナジラミ 1 検体ごとに、それぞれの **WF 検査液**による検査を行ってください。

1. サンプルの作製

本キットは、タバココナジラミ DNA の簡易抽出を行うための **WF 磨砕液**及び簡易プロトコルを備えています。

重要
本キットでは、**＜1−A. 直接採取法＞**を推奨していますが、直接の採取が困難な場合には、黄色粘着板を用いた**＜1−B. 黄色粘着板採取法＞**により、サンプルを作製してください。黄色粘着板の粘着成分がタバココナジラミに多量に付着している場合には、7 ページの**＜B'. エタノール洗浄法＞**により、サンプルを作製してください。

＜1−A. 直接採取法＞

1.5 ml チューブに 1 頭のタバココナジラミを採取し、**WF 磨砕液** 100 μl を添加します。
爪楊枝を用いて、採取したタバココナジラミを **WF 磨砕液**中で磨り潰してください。磨り潰した後、チューブを数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の撹拌をした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、その溶液を磨砕サンプルとします。

＜1−B. 黄色粘着板採取法＞

チューブラックに 1.5 ml チューブを準備し、**WF 磨砕液** 100 μl を分注します。
爪楊枝等で黄色粘着板上の 1 頭のタバココナジラミを採取し、爪楊枝ごと 1.5 ml チューブ内の **WF 磨砕液**に入れ、タバココナジラミを磨り潰してください。タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の撹拌をした後、スピンダウンします。その溶液を磨砕サンプルとします。

2. 検査反応

2-1. 試薬の融解

WF Q 検査液、**WF B/Q 検査液**、**ミネラルオイル**を取り出し、室温で完全に融解します。**WF 酵素液**と**蛍光発色液は**−20°C では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

2-2. 混合とスピンダウン

チューブを数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の撹拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

2-3. 検査溶液の作製

2 本の検査溶液調製用チューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）を用意し、下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。**WF Q 検査液**を加えた方を Q 検査溶液、**WF B/Q 検査液**を加えた方を B/Q 検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量（各検査溶液にサンプル 2.0 µl を添加して 10.0 µl とする)＞

試薬	1 テスト分	
	Q 検査溶液	B/Q 検査溶液
WF 検査液	7.2 µl	7.2 µl
蛍光発色液	0.4 µl	0.4 µl
WF 酵素液	0.4 µl	0.4 µl
検査溶液合計	8.0 µl	8.0 µl

*分注時の液量の不足を防ぐため、数テスト分多めに作製する。

2-4. 検査溶液の分注

核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、磨砕サンプル 1 検体あたり 2 本の検査用チューブを用意し、Q 検査溶液、B/Q 検査溶液をそれぞれのチューブに 8.0 µl ずつ分注します。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、及び材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

2-5. DNA サンプルの添加

磨砕サンプル 2.0 µl を各検査溶液に添加します。全てのサンプルを添加した後、各チューブに**ミネラルオイル**を 20.0 µl 程度重層してから、キャップを閉じてください。コントロールを作製する場合、最初に、陰性コントロール検査溶液のチューブに**核酸フリー水** 2.0 µl を添加し、**ミネラルオイル**を 20.0 µl 程度重層してから、キャップを閉じます。最後に、陽性コントロール検査溶液のチューブに **WF 陽性コントロール** 2.0 µl を添加し、**ミネラルオイル**を 20.0 µl 程度重層してから、キャップを閉じます。

重要

蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますので、本キットに添付の**ミネラルオイル**を必ず重層してから、キャップを閉じてください。

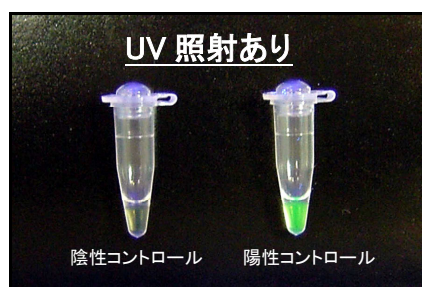
2-6. 検査反応

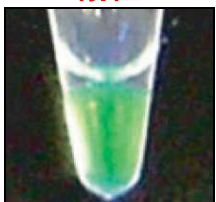
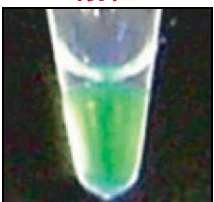
ヒートブロック

フロート

全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 × 3 回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、サーマルサイクラー、インキュベーター、あるいはウォーターバスとフロートを用いて 60℃ で 1 時間保温します。

3. 判定

3-1. 検査の成否の判定

1 時間経過後、80°C で 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UV を照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途 UV 照射装置（240-260 nm あるいは 350-370 nm の波長を出力）及び防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は 1 時間が経過した時点で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

3-2. 検体の判定

判定は蛍光の発色の有無を確認してください。

【判定のポイント】

発色パターン	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
Q 検査溶液	陽性	陰性	陰性	陽性
B/Q 検査溶液	陽性	陽性	陰性	陰性
バイオタイプ	**Q**	**Q 以外**	下記を参照してください	

＜発色パターンⅠ＞

「**Q 検査溶液**陽性かつ **B/Q 検査溶液**陽性 ＝ **バイオタイプ Q**」と判定します。

仮にQ検査溶液で蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められる場合には、他のタバココナジラミを採取して検査を行うか、専門の試験場等で詳細な検定を受けてください。

＜発色パターンⅡ＞

「**Q 検査溶液**陰性かつ **B/Q 検査溶液**陽性 ＝**Q 以外のバイオタイプ**」と判定します。

この検体はバイオタイプ B に分類される可能性があります。

＜発色パターンⅢ＞

「**Q 検査溶液**陰性かつ **B/Q 検査溶液**陰性 ＝ **バイオタイプ Q 及び B 以外**」と判定します。

この場合は下記のいずれかに該当する可能性があります。

- 従来系統のタバココナジラミ
- オンシツコナジラミ
- コナジラミ以外

＜発色パターンⅣ＞

この発色パターンを示した場合、**WF 陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」及び**核酸フリー水**を添加する「陰性コントロール検査溶液」を作製し、再度検査を行ってください。

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因及び対処法
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. WF 陽性コントロールの添加量が適切でない。** WF 陽性コントロールの添加量が取扱説明書の指示と異なる場合、検査反応の効率が低下する場合があります。WF 陽性コントロールの添加量は取扱説明書の指示に従ってください。 **B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型 DNA となる核酸の混入が疑われます。試薬及び検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 **C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存及び取扱は本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付のミネラルオイルを必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240-260 nm あるいは 350-370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行ってください。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じてください。

6. 文献・資料

1. 上田 重文 (2006) タバココナジラミバイオタイプ Q の簡易識別法 九州病害虫研究会報 **52**: 44-48

2. 上田 重文 (2007) タバココナジラミバイオタイプ Q の簡易識別法 植物防疫 **61** (6): 309-314

3. 福田 至朗、吉田 桂子、神戸 三智雄 (2003) LAMP 法によるトマト黄化葉巻ウイルス検出技術の開発 ブレインテクノニュース **100**: 28-31

4. 福田 至朗、穴井 尚子、加藤 政司、吉村 幸江、深谷 雅博、矢部 和則、大矢 俊夫、神戸 三智雄 (2005) 簡易な鋳型調製による loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出 関西病虫害研究会報 (47): 37-41

5. 竹内 良彦、福田 至朗、大矢 俊夫 (2006) タバココナジラミのバイオタイプ Q を LAMP 法により迅速に識別できる 平成 18 年度 関東東海北陸農業研究成果情報

6. 福田 至朗、矢部 和則 (2007) LAMP 法によるトマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) 簡易検出法の開発とその応用 農業技術 62 (7): 307-311

7. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28** (12), e63

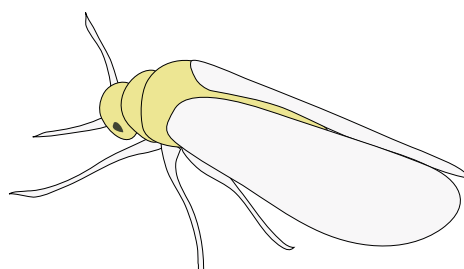
8. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3):358

7. 付録

【品質管理】

キットに添付の **WF 陽性コントロール** 2.0 µl を検定用サンプルとして 10 µl (1 テスト分) のスケールで DNA 増幅反応を行い、60°C、1 時間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。
キットに添付の**核酸フリー水** 2.0 µl を検定用サンプルとして 10 µl (1 テスト分) のスケールで DNA 増幅反応を行い、60°C、1 時間で**蛍光発色液**が発色しないことを確認しています。

【陽性コントロールのコピー数】

WF 陽性コントロールには、2.0 µl あたり 1×10^9 コピーの標的配列が含まれています。

- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2012 年 11 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-5977-5573
FAX	03-5977-5574
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp